

学校编码：10384

学号：24520081153426

密级_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Kv1.3 通道阻断剂抑制动脉粥样硬化大鼠过度活化的 CD4⁺ T 淋巴细胞

Slective Kv1.3 blocker inhibit the over activated CD4⁺ T cells in atherosclerosis rats

付莉

指导教师姓名： 王焱 教授

专 业 名 称： 内 科 学

论文提交日期： 2011 年 4 月

论文答辩日期： 2011 年 6 月

2011 年 6 月

Kv1.3 通道阻断剂抑制动脉粥样硬化大鼠过度活化的 CD4⁺ T 淋巴细胞

付莉

指导教师 王焱 教授

厦门大学

Kv1.3 通道阻断剂抑制动脉粥样硬化大鼠过度活化的 CD4⁺T 淋巴细胞

付莉

指导教师

王焱 副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 研究 CD4⁺T 淋巴细胞上 Kv1.3 通道在大鼠 AS 疾病过程中的作用, 探讨特异性阻断 Kv1.3 通道对大鼠 AS 病情的影响以及可能的机制。

方法: 实验动物分为对照组、模型组和药物处理组。模型组给予初始维生素 D3 负荷量腹腔注射, 联合高脂饲料持续喂养 (8 周); 药物处理组在模型组的基础上加用特异性 Kv1.3 通道阻断剂 ShK(L5), 10ug/kg/d, 皮下注射, 持续 8 周。分离大鼠脾脏淋巴细胞, 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞中 CD4⁺T 细胞在总 T 淋巴细胞中所占的比例。利用免疫磁珠法分选出脾脏中的 CD4⁺T 细胞; 流式细胞术检测其中 CCR7⁺的 T_{EM} 细胞所占比例的变化; 提取 RNA, 实时荧光定量 RT-PCR 检测各细胞中 Kv1.3 通道及细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN- γ 的表达; 体外培养 48 小时, MTT 法测定各组大鼠 CD4⁺T 细胞在刀豆蛋白 A (ConA) 刺激下的增殖能力, ELISA 法检测细胞培养上清液中细胞因子 IL-2、IL-10、IFN- γ 及 TNF- α 的浓度。

结果: 1. AS 大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞在总 T 淋巴细胞中所占比例较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$), 免疫功能明显激活: 多种细胞因子 mRNA 的表达水平明显上调 ($P < 0.01$); 在 ConA 的刺激下, AS 大鼠 CD4⁺T 细胞增殖能力和炎症因子分泌均增强 ($P < 0.05$)。2. AS 大鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞 Kv1.3 通道及 CCR7⁺细胞亚群表达升高 ($P < 0.05$)。3. 特异性 Kv1.3 钾离子通道阻断剂 ShK(L5)抑制 AS 大鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺T 细胞表达的上调及免疫功能的活化使之接近正常 (与正常对照组相比 $P > 0.05$); ShK(L5)抑制 AS 大鼠增多的 CD4⁺T 细胞上 kv1.3 的表达 ($P < 0.001$), 使增多的 CCR7⁺细胞亚群降至正常 (与正常对照组相比 $P > 0.05$)。

结论: AS 大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞增殖活化, 且观察到 Kv1.3 表达的增加、T_{EM} 细胞群增殖; 应用特异性 Kv1.3 阻断剂后 CD4⁺T 细胞活化被抑制, T_{EM} 亚群增殖受限。此结果提示阻断 Kv1.3 通道可通过抑制 T_{EM} 细胞增殖活化, 降低 CD4⁺T 细胞免疫功能, 可能是 AS 治疗的一个新靶点。

关键词: CD4⁺T 细胞 Kv1.3 通道 大鼠 动脉粥样硬化 ShK(L5)

Abstract

Objective: To investigate the role of voltage-gated potassium channel Kv1.3 of CD4⁺ T lymphocytes in rat's atherosclerosis, find out whether the selective Kv1.3 blocker ShK(L5) can alleviate rats' atherosclerosis, and to discuss how the selective Kv1.3 blocker affect the progress of atherosclerosis.

Methods: Rats were divided into 3 groups: control group, AS group and ShK(L5) treated group. AS rat models were given overload VitD3 intraperitoneal injection and then fed with high lipid diet for 8 weeks; ShK(L5) was administered once daily (8 weeks) by subcutaneous injection (10 ug/kg) on the basis of VitD3 overloading and high lipid diet. Splenocytes were isolated and the percentage of CD4⁺ T cell in each group were detected by flow cytometry. CD4⁺ T cells were separated using immunomagnetic microbeads, used in the following experiment: flow cytometry detected the expression of CCR7; Real-time RT-PCR examined the qualification of Kv1.3 IL-2、IL-10 and IFN- γ gene; cultured with ConA for 48h and assessed the cells' ability to proliferate by MTT and IL-2, IFN- γ , IL-10 and TNF- α in the supernatants were tested by ELISAs.

Results:

1. Compared with normal control, spleen CD4⁺ T cell augmented its population in AS rats ($P<0.01$). And the immune effect of CD4⁺ T cell is activated: cytokine genes were up-regulated($P<0.01$); when stimulated by ConA, CD4⁺ T cells from AS rats were more likely to proliferate and to produce cytokines ($P<0.05$).
2. The Kv1.3 expression and the amount of CCR7⁺ T_{EM} cells increased observably in AS Rats' CD4⁺ T cell($P<0.05$).
3. Specific Kv1.3 blocker ShK(L5) suppressed the up-regulation of CD4⁺ T cells, and inhibited the immune response of CD4⁺ T cell in AS rats ($P>0.05$, compared with normal control). Also, ShK(L5) decreased the augmented expression of Kv1.3 in CD4⁺ T cells from AS rats($P<0.001$). When treated with ShK(L5), the increased CCR7⁺ T_{EM} cells in AS CD4⁺ T cell lowered down to the level of normal control ($P>0.05$).

Conclusion: CD4⁺ T cells in AS rats is activated. And the expression of Kv1.3 and CCR7⁺ T_{EM} cells were increased significantly. Selective Kv1.3 blockade treatment in AS rats can suppress the up-regulation of CCR7⁺ T_{EM} cells, inhibit the immune efficiency of CD4⁺ T cell. We assume Kv1.3 blocker might be a novel target for AS treatment.

Keywords: CD4⁺ T cell; Kv1.3 potassium channel; rat; atherosclerosis; ShK(L5)

厦门大学博硕士

目 录

前 言	1
第一章 AS 大鼠脾脏 CD4 ⁺ T 淋巴细胞亚群数量及功能的研究	4
1.1 材料和方法	4
1.2 实验结果	12
1.3 讨论	15
1.4 结论	17
第二章 KV1.3 钾通道在 AS 大鼠脾脏 CD4 ⁺ T 细胞中的表达	18
2.1 材料和方法	19
2.2 结果	22
2.3 讨论	23
2.4 结论	24
第三章 阻断 KVL3 通道对 AS 大鼠 CD4 ⁺ T 细胞亚群的影响.....	25
3.1 材料和方法	26
3.2 结果	30
3.3 讨论	33
3.4 结论	35
附 录	37
参 考 文 献	39
综述	42

Table of Contents

Introduction.....	1
Chapter 1 The population and function of CD4⁺T cell in AS rats.....	4
1.1 Material and method.....	4
1.2 Results.....	12
1.3 Discussion	15
1.4 Conclusion	17
Chapter 2 The expression of Kv1.3 channel in AS rats' spleen CD4⁺T cell.....	18
2.1 Material and method.....	19
2.2 Results.....	22
2.3 Discussion.....	23
2.4 Conclusion.....	24
Chapter 3 The effect of blockade Kv1.3 channel on AS rats' CD4⁺ T cell...25	25
3.1 Material and method.....	26
3.2 Results.....	30
3.3 Discussion	33
3.4 Conclusion	35
Appendices.....	36
References.....	38
Review.....	41

前言

动脉粥样硬化（Athrosclerosis, AS）以大中弹性动脉血管壁淋巴细胞和巨噬细胞浸润、泡沫细胞形成、平滑肌细胞增生迁移，及细胞外基质、脂质堆积为主要的病理特征。尽管抗血小板、调脂、降低血压、控制血糖等治疗措施的应用对心脑血管事件的发生和致死率有了明显的改善，AS仍然是冠心病和脑卒中的首要因素,大约占据着西方国家死亡原因的一半，在我国AS的发病率、致残率及致死率也呈逐年上升的趋势，探明AS发生发展中的病理生理机制，寻求新的更为有效的预防和治疗措施，是全球医药卫生系统共同面临的一项重大课题。

一个多世纪以来，人们对于AS发病机制的认识不断深入，目前最为广泛接受的是Ross提出的损伤-反应学说^[1]，该学说认为动脉对各种致病因素引起的内膜损伤作出反应是粥样斑块的形成的基础。1999年Ross又进一步明确指出“AS是一种炎症性疾病”^[2]；AS的病理损害也具有变质、渗出、增生这些炎症的基本病理特征，血管壁内各种细胞间的相互作用与肾小球硬化、类风湿性关节炎、肝硬化等慢性炎症纤维增生性疾病无明显不同。参与AS发生、发展的有血管内皮细胞、平滑肌细胞、血小板和单核/巨噬细胞和T淋巴细胞。其中T淋巴细胞的趋化聚集、活化和炎症因子的分泌是AS发生的始动环节^[3,4]。在人类AS各个阶段的斑块组织中都可以观察到活化T淋巴细胞的聚集，其中以CD4⁺ T细胞为主，占70%，且T淋巴细胞的含量与病情的严重程度呈正相关^[5,6,7]。在对急性冠脉综合症患者的研究中发现，T淋巴细胞和单核细胞不仅在局部斑块中明显增多，且在外周血中也呈增多表现^[8]，这说明AS的免疫细胞活化已不只是局限在斑块局部，而是全身性的免疫系统的活化。

研究表明，T淋巴细胞免疫功能的活化与其细胞膜上离子通道的电活动密切相关^[9]。T淋巴细胞膜上的离子通道主要有三类，即钙离子通道、钾离子通道和氯离子通道^[10]。其中，钾离子通道介导的K⁺外流是T淋巴细胞膜电位形成的基础，钾离子通道功能状态的变化直接影响膜电位的水平，当细胞膜上的K⁺通道开放，K⁺外流使膜电位趋于负电位水平，驱动细胞外Ca²⁺持续向胞内移动，为T细胞的活化提供了必需的胞内Ca²⁺浓度。人类T细胞上的钾离子通道主要有电压门控钾通道

(voltage-gated potassium channel, Kv1.3 通道) 和钙离子激活的钾通道 (calcium-dependent potassium channel, Kca3.1通道)两种^[11,12]。

当机体受到外来或自身抗原刺激, 抗原提呈细胞将其吞噬加工成抗原肽-MHC 分子复合物呈递给T淋巴细胞。T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别并结合抗原肽-MHC分子复合物, 激活细胞内的酪氨酸激酶和磷脂酶C (phospholipase C, PLC), 分解磷脂生成三磷酸肌醇 (inositol (1,4,5)-trisphosphate [Ins(1,4,5)P3], IP3) 和甘油二酯 (diacylglycerol, DG)。IP3与内质网膜上相应的受体结合, 促使内质网中贮存的Ca²⁺释放并消耗, 因此细胞的活化需要胞外Ca²⁺持续向细胞内流动以维持细胞内的Ca²⁺浓度^[13]。升高的Ca²⁺浓度激活钙调蛋白依赖的钙调磷脂酶, 引起钙调磷脂酶-活化的T细胞核因子 (NF-AT) 等转录因子通路的级联反应, 调节IL-2、IFN- γ 和TNF- α 等细胞因子的表达和细胞增殖^[9,14,15]。在T细胞活化时K⁺外流作用加强, 使膜电位超极化, 促使胞外Ca²⁺通过T细胞膜上的钙释放激活钙通道 (Calcium release-activated Ca²⁺ channel, CRAC)内流, 增加的胞内Ca²⁺作为第二信使激活T细胞^[11,16]。因此钾离子通道通过对细胞膜电位和Ca²⁺信号通路的调控, 影响T细胞的活化和功能。

根据T细胞表面分子CD45的不同, 可将成熟T细胞分为两种类型: 初始T 细胞表达CD45RA; 记忆性T 细胞表达CD45RO。Federica Sallusto^[17]等在此基础上用趋化因子受体CCR7为表面标志把外周血CD4⁺T细胞分为三个亚群: 一是CD45RA⁺CCR7⁺的初始T细胞; 二是两类记忆性亚群, CD45RA⁻CCR7⁺中心记忆性T细胞 (T_{CM}细胞) 和CD45RA⁻CCR7⁻效应记忆性T细胞 (T_{EM}细胞)。静息状态下, 三个亚群细胞膜上均有相似数量的Kv1.3通道 (200~400/细胞) 和KCa3.1通道 (0~30/细胞) 的表达。当细胞被激活时, Kv1.3通道的表达仅在T_{EM}细胞亚群中显著上调 (~1500/细胞), Kv1.3通道介导的K⁺电流幅度明显增加。而在初始T细胞和T_{CM}细胞亚群则无明显变化。与T_{EM}不同, 活化的初始T细胞和T_{CM}细胞主要通过上调KCa3.1通道的数量增加K⁺外流, 促进Ca²⁺的内流完成细胞的活化, Kv1.3通道表达无明显升高^[13,18,19]。正是Kv1.3通道和KCa3.1在不同细胞亚群间的这种表达和功能差异, 为应用特异性的Kv1.3钾离子通道阻断剂治疗慢性炎症性疾病的安全性提供了理论依据。由于初始T细胞和T_{CM}细胞通过高表达KCa3.1钾离子通道完成细胞的活化, 使这两群细胞可逃逸Kv1.3阻断剂的抑制作用, 发挥正常的免疫效应, 不致引起免疫缺陷。

当前对Kv1.3通道的研究主要集中在自身免疫性疾病和移植排斥反应的治疗中。在对多种T细胞介导的慢性免疫性疾病,如多发性硬化^[20,21,22]、类风湿关节炎^[23]、I型糖尿病^[23]、wegener肉芽肿^[24]和肾移植排斥反应^[25]等多种免疫性疾病的研究中,记忆性T细胞亚群均出现紊乱,出现高表达Kv1.3通道的T_{EM}细胞亚群的上调。这些细胞可能是在疾病发病过程中,由初始T细胞在接受患者体内抗原反复刺激后分化而来。阻断Kv1.3通道,可以有效抑制T_{EM}细胞的增殖及细胞因子分泌;在自身免疫性疾病的体内研究中Kv1.3通道阻断剂也发挥了有益的治疗作用。

流行病学调查表明,在自身免疫性疾病的患病人群中AS相关的心脑血管并发症的发生率和死亡率显著上升,对造成这一现象的机制研究表明T细胞介导的免疫应答反应显著促进了AS在自身免疫性疾病患者中的发生和发展^[26, 27]。且本课题组成员的研究发现,临床相关浓度的酮色林显著降低Kv1.3通道的电流幅度,使通道失活,提示酮色林的抗AS作用可能通过阻断Kv1.3通道发挥^[28]。最近又有研究发现,在急性冠脉综合征(ACS)患者外周血T淋巴细胞Kv1.3蛋白的表达较正常人群明显增加,且膜片钳技术检测ACS患者T淋巴细胞Kv通道的电流幅度明显高于正常对照组^[29]。

这使研究者们认为高表达Kv1.3通道的T细胞在AS的发生和发展中可能发挥了重要的作用,Kv1.3通道有望成为AS治疗的一个新靶点。Kv1.3通道阻断剂可特异性抑制T_{EM}细胞的活化而不影响初始T细胞和T_{CM}细胞,不会导致机体整个细胞免疫功能的抑制,且Kv1.3通道在其他组织器官表达有限,被抑制后不会引起不良反应^[16]。近年,随着制药技术的不断发展,高特异性、高亲和力的Kv1.3通道阻断剂逐渐研发出现,也为针对Kv1.3通道的科研及靶向Kv1.3通道的治疗提供了可能^[33]。

本课题通过建立AS大鼠模型,采用流式细胞术、实时荧光定量RT-PCR、ELISA相结合的方法,观察AS大鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞CCR7⁺Tem亚群的变化、Kv1.3通道的表达以及免疫效应指标的检测,分析高表达Kv1.3的CD4⁺T细胞在AS病程中的作用;研究特异性Kv1.3通道阻滞剂对AS发生发展的影响及作用机制,探讨Kv1.3通道作为AS治疗新靶点的可能性。

第一章 AS 大鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群数量及功能的研究

AS是多种免疫细胞参与的慢性炎症性疾病^[3,4],其易发生斑块破裂和血栓形成,引起心脑血管事件,严重危害人类健康。在人类各个阶段的动脉粥样斑块中均可观察到有功能活化T淋巴细胞的浸润^[5],提示T淋巴细胞的免疫活动贯穿于动脉粥样硬化的始终。

根据细胞表面表达CD4或CD8, T淋巴细胞可分为CD4⁺辅助性T淋巴细胞(helper T cells, Th 细胞)和CD8⁺ 细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T cells, Tc细胞)。CD4⁺ T淋巴细胞通过识别并结合抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)表面MHC-II (major histocompatibility complex, 主要组织相容性复合物)递呈的多肽抗原而被激活。激活的CD4⁺T淋巴细胞增殖、活化,分泌多种细胞因子,调节和协助免疫反应。CD8⁺ T淋巴细胞识别MHC-I类分子结合的抗原肽,在短时间内具有连续特异性杀伤靶细胞的功能。

在人类^[5,6,7]和apoE-/- 和LDLR-/- 小鼠模型^[31]的动脉粥样斑块里CD4⁺ T淋巴细胞都是最主要的T淋巴细胞亚群。免疫缺失的apoE-/- 小鼠,体内过继转移CD4⁺ T淋巴细胞后将使动脉粥样硬化加重^[32]。这些都表明CD4⁺T淋巴细胞在动脉粥样硬化形成过程中发挥着重要的推动作用。本实验通过流式细胞术测定大鼠脾脏中CD4⁺T淋巴细胞亚群数量、荧光实时定量RT-PCR检测CD4⁺T淋巴细胞炎症因子的表达以及测定CD4⁺ T淋巴细胞对非特异性抗原刺激的反应,研究AS大鼠脾脏CD4⁺ T淋巴细胞亚群数量及免疫效应功能的变化。

1.1 材料和方法

1.1.1 实验材料

1.1.1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠16只,体重180~200g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.1.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
超净工作台	美国 Axygen 公司
一次性组织研磨器	上海飞捷生物科技有限公司
4℃冰箱	青岛海尔公司
-20℃低温冰箱	青岛海尔公司
-80℃低温冰箱	美国 Thermo 公司
台式离心机	美国 Beckman 公司
低温超速离心机	德国 Eppendorf 公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
显微镜	日本 Olympus 公司
磁性分离架	宁波新芝生物科技股份有限公司
流式细胞仪(COULTER EPICS)	美国 Backman 公司
实时荧光定量PCR仪 (ABI7500)	美国 ABI 公司
细胞培养箱 (Thermo Model3111)	苏州江东精密仪器有限公司
电子分析天平	德国 Sartorius 公司
0.22um滤过膜	美国 Millipore 公司
酶标仪	美国 Bio-rad iMARK 公司

1.1.1.3 主要实验试剂

细胞分选及培养用试剂

试剂名称	生产厂家
EZ-Sep TM Mouse 1×淋巴细胞分离液	深圳达科为生物技术有限公司
MagCelect Rat CD4 ⁺ T 细胞分选试剂盒	美国 R&D Systems 公司
PBS	北京索莱宝科技有限公司
RPMI-1640培养液	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
100×青霉素-链霉素混合液	北京索莱宝科技有限公司
ConA	北京索莱宝科技有限公司

流式细胞术标记抗体

试剂名称	生产厂家
FITC标记抗大鼠CD3抗体	美国 eBioscience 公司
FITC标记 Mouse IgG3同型抗体	美国 eBioscience 公司
PE-Cy5标记抗大鼠CD4抗体	美国 BD Pharmingen 公司
PE-Cy5标记 Mouse IgG2a, κ 同型抗体	美国 BD Pharmingen 公司

荧光实时定量RT-PCR

试剂名称	生产厂家
RNA提取试剂 (Trizol)	美国 Invitrogen 公司
焦炭酸二乙酯处理水 (DEPC处理水)	美国 Amresco 公司
氯仿	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
逆转录试剂盒	日本 Toyobo 公司
大鼠GAPDH 引物	美国 Invitrogen 公司
大鼠IL-2引物	美国 Invitrogen 公司
大鼠IL-10引物	美国 Invitrogen 公司
大鼠IFN- γ 引物	美国 Invitrogen 公司
SYBR Green Realtime PCR Master Mix-plus	日本 Toyobo 公司

ELISA 试剂盒

试剂名称	生产厂家
IL-2	深圳欣博盛生物科技有限公司
IL-10	深圳欣博盛生物科技有限公司
IFN- γ	深圳欣博盛生物科技有限公司
TNF- α	深圳欣博盛生物科技有限公司

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕